

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

AA

(11)Publication number : 2002-262883

(43)Date of publication of application : 17.09.2002

(51)Int.CI.

C12N 15/09
C07K 1/113
C12N 1/15
C12N 1/19
C12N 1/21
C12N 5/10
C12P 21/08
// C12N 9/90
(C12P 21/08
C12R 1:01)

(21)Application number : 2001-070928

(71)Applicant : SEKISUI CHEM CO LTD
MARINE BIOTECHNOL INST CO
LTD

(22)Date of filing :

13.03.2001

(72)Inventor : IDENO AKIRA
MARUYAMA TADASHI
FURUYA MASAHIRO**(54) METHOD FOR PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODY****(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a low cost, efficient and *in vitro* method for producing a monoclonal antibody having a high specificity and high affinity.

SOLUTION: This method for producing the monoclonal antibody is provided by (a) co-expressing an antibody gene with a gene encoding a PPIase having a chaperone-like activity in a transformed body, and producing the monoclonal antibody as a soluble fraction, or (b) solubilizing the monoclonal antibody expressed as an inclusion body with a modifying agent, and further folding it in the presence of the PPIase having the chaperone-like activity.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-262883

(P2002-262883A)

(43) 公開日 平成14年9月17日 (2002.9.17)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ド*(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 0 7 K 1/113	4 B 0 2 4
C 0 7 K 1/113		C 1 2 N 1/15	4 B 0 5 0
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 4
1/19		1/21	4 B 0 6 5
1/21		C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-70928 (P2001-70928)

(22) 出願日 平成13年3月13日 (2001.3.13)

(71) 出願人 000002174

積水化学工業株式会社

大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号

(71) 出願人 591001949

株式会社海洋バイオテクノロジー研究所

東京都文京区本郷1丁目28番10号

(72) 発明者 井手野 晃

岩手県釜石市平田第3地割75番1 株式会

社バイオテクノロジー研究所釜石研究所内

(74) 代理人 100106596

弁理士 河備 健二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗体の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 安価で、効率的な、イン・ビトロでの高特異性、高親和性モノクローナル抗体の製造方法の提供。

【解決手段】 (a) 抗体遺伝子とシャベロン様活性を有するP P I a s eをコードする遺伝子とを形質転換体内で共発現させ、モノクローナル抗体を可溶画分として產生させること、又は、(b) 封入体として発現させたモノクローナル抗体を、変性剤によって可溶化させ、さらにシャベロン様活性を有するP P I a s eの共存下でフォールディングさせることにより提供。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗体遺伝子とシャベロン様活性を有するPP I a s eをコードする遺伝子とを含む形質転換体。

【請求項2】 請求項1に記載の形質転換体を培養して、抗体遺伝子とシャベロン様活性を有するPP I a s eをコードする遺伝子とを形質転換体内で共発現させ、モノクローナル抗体を可溶画分として産生させることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項3】 シャベロン様活性を有するPP I a s eをコードする遺伝子が、古細菌由来FKBPタイプPP I a s e遺伝子、バクテリア由来トリガーファクタータイプPP I a s e遺伝子、及び真核生物由来FKBP52タイプPP I a s e遺伝子からなる群から選ばれた少なくとも1種であることを特徴とする請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項4】 古細菌由来FKBPタイプPP I a s e遺伝子が、16~18kDaの古細菌由来FKBPタイプPP I a s eをコードする遺伝子であることを特徴とする請求項3に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項5】 抗体遺伝子が、F a b遺伝子であることを特徴とする請求項1~4のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項6】 F a b遺伝子が、マウスIgG由来F a b遺伝子であることを特徴とする請求項5に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項7】 インクルージョンボディとして発現させたモノクローナル抗体を、変性剤によって可溶化させ、さらにシャベロン様活性を有するPP I a s eの共存下でフォールディングさせることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項8】 シャベロン様活性を有するPP I a s eが、古細菌由来FKBPタイプPP I a s e、バクテリア由来トリガーファクタータイプPP I a s e、及び真核生物由来FKBP52タイプPP I a s eからなる群から選ばれた少なくとも1種であることを特徴とする請求項7に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項9】 古細菌由来FKBPタイプPP I a s eが、16~18kDaの古細菌由来FKBPタイプPP I a s eであることを特徴とする請求項8に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項10】 モノクローナル抗体が、F a bであることを特徴とする請求項7~9のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項11】 F a bが、マウスIgG由来のF a bであることを特徴とする請求項10に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、イン・ビトロでのモノクローナル抗体の製造方法に関し、さらに詳しく

は、シャベロン様活性を有するPP I a s eの機能を利用した、安価で、高効率な、イン・ビトロでの高特異性、高親和性モノクローナル抗体の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 抗体は、分子量が10万Daを越える巨大分子であり、特定の抗原物質に特異的に結合する機能が利用され、分析用試薬、生体外診断薬等として幅広く使用されている。抗体分子において、抗原物質との結合に寄与している部分は、V領域（可変領域）と呼ばれ、H鎖のV領域とL鎖のV領域とから構成されている。特定抗原に対する抗体を取得する方法としては、ラットやウサギ等の実験動物に抗原物質を免疫感作させ、その血清に含まれる抗体（ポリクローナル抗体）を得る方法と、次に述べるモノクローナル抗体を得る方法が一般的である。

【0003】 モノクローナル抗体は、単一クローンの抗体産生細胞が産生する抗体であり、その特徴は一次構造が均一なことである。モノクローナル抗体は、ケーラーとミルシュタインによるハイブリドーマ技術の確立によって容易に製造できるようになった。この方法では、まず、所定の抗原物質をマウス等の実験動物に投与して免疫感作を行う。次に、免疫感作された動物の脾臓から、該抗原物質に対する抗体産生能を獲得した脾臓細胞を取り出し、これをミエローマのような適切な腫瘍細胞と融合させてハイブリドーマを作製する。次いで、ELISA等の適当な免疫分析法を用いたスクリーニングにより、目的の抗体物質を産生しているハイブリドーマを選択する。その後、限界希釈法等を用いてクローニングすることにより、目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株を樹立する。こうして樹立されたハイブリドーマを適当な培地中で培養した後、その代謝産物を含む培地をクロマトグラフ等を用いて分離することにより、目的のモノクローナル抗体が得られる。

【0004】 現在、ハイブリドーマ技術はモノクローナル抗体を取得するための方法として汎用されているが、この方法は、動物に対する免疫感作というイン・ビトロでの生体反応を利用していているため、必然的に実験動物の介在を必要とする。即ち、モノクローナル抗体を取得するためには、実験動物を飼育維持しなければならず、煩雑な労力を必要とするとともに、多大なコストが必要となる。また、この方法では、生体反応を利用して試行錯誤的な要素が含まれ、必ずしも全ての抗原物質に対するモノクローナル抗体が製造できるとは限らないという問題がある。

【0005】 一方、近年、遺伝子工学技術が飛躍的に進歩し、大腸菌の表層に、抗体のH鎖及びL鎖のV領域のみを適当なリンカーを介して連結させたscFv（single chain Fv）、抗体のF a b部分等を発現することが可能となった。また、PCR法を用いて抗体遺伝子をランダムに増幅することで抗体遺伝子のラ

イブラーを作製、細胞外に提示させ、これらのライブラーから特定抗原に親和性を有するものをスクリーニングする方法が開発されつつある（熊谷ら、タンパク質・核酸・酵素、1998、43、159-167）。従って、このスクリーニング法によって得られた抗体遺伝子を、大腸菌等を用いて遺伝子工学的に発現できれば、実験動物を用いることなく目的の抗原に対する抗体を生産することが可能となる。

【0006】しかしながら、上記技術には、例えば、大腸菌を用いて抗体遺伝子を大量発現させる場合、抗体のほとんどが不溶性のインクルージョンボディ（封入体）として発現され、活性型を直接的に得ることはできないという問題がある。

【0007】このため、抗体遺伝子にシグナル配列を連結し、ペリプラズム領域に抗体を分泌発現させる方法も提案されているが、分泌量が極めて少ない（Pluckthun, Biotechnology, 1991, 9, 545）ため、実用的な方法とはいひ難い。ところで、FabはscFVと比べて構造が安定であるため機能性に優れているという利点を有するが、技術的な困難性が高いためか、scFVタイプの抗体の大腸菌細胞内での発現に関する報告（Wirts et al., (2000) Protein Sci. 8, 2245）はあるものの、Fabタイプの抗体の発現に関する報告は未だない。

【0008】また、活性型の抗体を効率的に生産するために、タンパク質の立体構造形成や構造変化に関与する因子を、抗体のリフォールディングに利用することも検討されており、例えば、特開平9-220092号公報には、封入体として発現された抗体を、塩酸グアニジン等で可溶化し、シャベロニンを用いてリフォールディングさせる方法や、抗体遺伝子をシャベロニン遺伝子と大腸菌内で共発現させる方法が開示されている。しかしながら、シャベロニンをタンパク質生産に応用する場合には、ATP、CTP、UDPといった高エネルギー物質を共存させる必要があり、また、シャベロニンは、目的タンパク質と1:1のモル比率で作用するため、分子量が100万Daに近い高分子量のシャベロニンを目的タンパク質に対して非常に高濃度で用いる必要もあり、利便性に欠け、経済性にも欠けるという問題がある。

【0009】なお、シャベロニンは、熱ショックタンパク質の一群であり、細胞が温度変化等の様々な環境ストレスにさらされた際に產生されるが、これらは、原核生物、真核生物を問わず広く存在しており、特に、大腸菌から產生される分子シャベロンとしてのGroEが良く知られている。また、このGroEは、タンパク質の種類を選ばず、非特異的にタンパク質の立体構造形成に関与することも明らかにされている。例えば、上記GroEの構成体であるGroELは、7個のサブユニットが環状に連なったドーナツ型構造が2段に重なった、合計

14サブユニットからなる特徴的な構造を有しているが、このドーナツ構造の凹部に変性タンパク質を捕捉し、ATP等のヌクレオチドの消費と、補助因子であるGroESの結合によって、変性タンパク質を正しい立体構造のタンパク質へと効率的に折り畳むことが知られている。

【0010】さらに、特開平11-285398号公報には、メタノコッカス属細菌から調製したPPase（Peptidyl prolyl cis-trans isomerase）を変性タンパク質のリフォールディングに利用することが開示されているが、高い特異性、親和性を要求される抗体のリフォールディングへの適用は検討されておらず、また、変性タンパク質のリフォールディング効率の点からも十分満足できるものではなかった。なお、PPaseは、後述のように、ポリペプチド鎖中のプロリン残基のN末端側ペプチド結合の回転を促し、タンパク質高次構造の再生速度を促進させる機能（PPase活性）を有する酵素である。

【0011】上記のとおり、実験動物を用いることなく、目的の抗原に対する抗体を遺伝子工学的に生産するための方法が種々検討されているが、発現-フォールディング効率の点からは十分満足できるものではなく、高い特異性、親和性を有するモノクローナル抗体を遺伝子工学的に生産する方法のさらなる効率向上が望まれていた。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記の従来技術の問題点に鑑み、安価で、高効率な、インピトロでの高特異性、高親和性モノクローナル抗体の製造方法を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を達成すべく鋭意研究した結果、(a)抗体遺伝子とシャベロン様活性を有するPPaseをコードする遺伝子とを形質転換体内で共発現させ、モノクローナル抗体を可溶画分として產生させること、又は、(b)インクルージョンボディとして発現させたモノクローナル抗体を、変性剤によって可溶化させ、さらにシャベロン様活性を有するPPaseの共存下でフォールディングさせることにより、上記課題が達成されることを見出し、斯かる知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0014】即ち、本発明の第1の発明によれば、抗体遺伝子とシャベロン様活性を有するPPaseをコードする遺伝子とを含む形質転換体が提供される。

【0015】また、本発明の第2の発明によれば、第1の発明の形質転換体を培養して、抗体遺伝子とシャベロン様活性を有するPPaseをコードする遺伝子とを形質転換体内で共発現させ、モノクローナル抗体を可溶画分として產生させることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0016】また、本発明の第3の発明によれば、第1又は第2の発明において、シャベロン様活性を有するPPaseをコードする遺伝子が、古細菌由来FKBPタイプPPase遺伝子、バクテリア由来トリガーファクタータイプPPase遺伝子、及び真核生物由来FKBP52タイプPPase遺伝子からなる群から選ばれた少なくとも1種であることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0017】また、本発明の第4の発明によれば、第3の発明において、古細菌由来FKBPタイプPPase遺伝子が、16~18kDaの古細菌由来FKBPタイプPPaseをコードする遺伝子であることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0018】また、本発明の第5の発明によれば、第1~第4のいずれかの発明において、抗体遺伝子が、Fab遺伝子であることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0019】さらに、本発明の第6の発明によれば、第5の発明において、Fab遺伝子が、マウスIgG由来Fab遺伝子であることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0020】一方、本発明の第7の発明によれば、インクルージョンボディとして発現させたモノクローナル抗体を、変性剤によって可溶化させ、さらにシャベロン様活性を有するPPaseの共存下でフォールディングさせることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0021】また、本発明の第8の発明によれば、第7の発明において、シャベロン様活性を有するPPaseが、古細菌由来FKBPタイプPPase、バクテリア由来トリガーファクタータイプPPase、及び真核生物由来FKBP52タイプPPaseからなる群から選ばれた少なくとも1種であることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0022】また、本発明の第9の発明によれば、第8の発明において、古細菌由来FKBPタイプPPaseが、16~18kDaの古細菌由来FKBPタイプPPaseであることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0023】また、本発明の第10の発明によれば、第7~第9のいずれかの発明において、モノクローナル抗体が、Fabであることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0024】さらに、本発明の第11の発明によれば、第7~第9のいずれかの発明において、モノクローナル抗体が、マウスIgG由来のFabであることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0025】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

【0026】1. PPase (Peptidyl prolyl cis-trans isomerase)

peptidyl prolyl cis-trans isomerase

本発明で用いられるPPase (Peptidyl prolyl cis-trans isomerase) は、シャベロン様活性を有する、古細菌由来のFKBPタイプPPase、バクテリア由来トリガーファクタータイプPPase、及び真核生物由来52kDa FKBPタイプPPaseからなる群から選ばれた少なくとも1種のPPaseである。

【0027】PPaseは、免疫抑制剤として知られるサイクロスボリンやFK506のターゲット分子であり、これらの免疫抑制剤に対する感受性から、シクロフィリンタイプとFKBP (FK506 binding protein) タイプとに大別される。

【0028】また、PPaseは、ポリペプチド鎖中のプロリン残基のN末端側ペプチド結合のシストラヌス異性化反応を触媒することにより、タンパク質高次構造の再生速度を高める機能 (PPase活性) を有することから、前記シャベロニンと同様に、タンパク質の安定化や変性タンパク質の再生に利用できるものとして期待されていた。

【0029】興味深いことに、古細菌由来のFKBPタイプPPaseは、上記PPase活性だけでなく、本来シャベロニンの機能とされていた、タンパク質巻き戻りの収量そのものを増大させる活性やタンパク質の不可逆的凝集を抑制する活性 (シャベロン様活性) を有し (Maruyama et al., 2000, Front Biosci. 2000 Sep 1, 5, D821-836)、また、このシャベロン様活性

は、バクテリア由来のトリガーファクター型PPase (Huang, G. -C., et al. (2000) Protein Sci. 9, 1254-1261)、真核生物由来FKBP52タイプPPase (Bose, S., et al. (1996) Science 274, 1715-1717) にも見られる機能である。

【0030】また、PPaseは、シャベロニンとは異なり、タンパク質生産への応用において、ATP等といった高エネルギー物質を必要とせず、分子量が小さいため、安価で、かつ取り扱い上の利便性も高く、さらに、発現-フォールディングの効率も高いという特徴を有する。

【0031】ここで、上記のシャベロン様活性は、ロダネーゼやクエン酸合成酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素等をモデル酵素とし (河田1998, バイオサイエンスとインダストリー56, 593-598)、これらを6M塩酸グアニジン等のタンパク質変性剤で変性処理後、PPaseやシャベロニンを含む緩衝液で変性剤を希釈した際に開始する変性タンパク質の再生率や、変性タンパク質の凝集の抑制率で評価することができる。変性タンパク質の再生率を評

価する方法としては、例えば、ホロビッチらの方法が (Horowitz, 1995, *Methods Mol. Biol.* 40, 361-368)、変性タンパク質の凝集抑制を評価する方法としては、田口らの方法 (Taguchi et al. 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 8529-8534) 等がそれぞれ挙げられる。

【0032】なお、上記の免疫抑制剤に非感受性でアミノ酸配列のホモロジーも異なるバープリン (Parvulin) タイプが近年見つかってきており、また、バクテリア由来のトリガーファクターはFKBPと相同性の高い領域を持つため、FKBPタイプPPaseのサブクラスと位置づけられている。

【0033】本発明で用いられる古細菌由来のFKBPタイプPPaseとしては、例えば、アシディアヌス (Acidianus) 属、メタロスphaera (Metallocphaera) 属、スティジオロバス (Stygiolobus) 属、スルフォロバス (Sulfolobus) 属、スルフロコッカス (Sulfurooccus) 属及びスルフリスphaera (Sulfurisphaera) 属等のスルフォロバレス (Sulfolobales) 目、アエロバイラム (Aeropyrum) 属、デスルフロコッカス (Desulfurococcus) 属、ステッテリア (Stetteria) 属、スタフィロサーマス (Staphylothermus) 属、サーモディスカス (Thermodiscus) 属、イグネオコッカス (Ignneococcus) 属、サーモスphaera (Thermosphaera) 属、スルフォフォボコッカス (Sulfophobococcus) 属、ハイバーサーマス (Hyperthermus) 属、バイロディクティウム (Pyrodictium) 属、及びバイロロバス (Pyrolobus) 属等のイグネオコッカレス (Ignneococcales) 目、バイロバキュラム (Pyrobaculum) 属、サーモプロテウス (Thermoproteus) 属、サーモフィラム (Thermofilum) 属、及びカルドコッカス (Caldococcus) 属等のサーモプロテアレス (Thermoproteales) 目、アーキオグロブス (Archaeoglobus) 属、及びフェログロブス (Ferroglobus) 属等のアーキオグロバレス (Archaeoglobales) 目、メタノサーマス (Methanothermus) 属、メタノバクテリウム (Methanobacterium) 属、メタノサーモバクター (Methanothermobacter) 属、及びメタノスphaera (Methanospaera) 属等のメタノバクテアレス (Methanobacteriales) 目、メタノコッカス (Methanococcus) 属、メタノサーモコッカス (Methanothermococcus) 属、メタノカルドコッカス (M

ethanocaldococcus) 属、及びメタノイグニス (Methanoidignis) 属等のメタノコッカレス (Methanococcales) 目、メタノミクロバイアレス (Methanomicrobiales) 目、メタノザルチナ (Methanosaarcina) 属等のメタノザルチナレス (Methanosaarcinales) 目、メタノバイラレス (Methanopyrales) 目、バイロコッカス (Pyrococcus) 属、及びサーモコッカス (Thermococcus) 属等のサーモコッカレス (Thermococcales) 目、サーモプラズマ (Thermoplasma) 属、及びピクロフィラス (Picropilius) 属等のサーモプラズマレス (Thermoplaesmales) 目、ハロバクテリウム (Halobacterium) 属、ハロコッカス (Halococcus) 属、ナトゥノバクテリウム (Natronobacterium) 属、ナトゥノコッカス (Natronococcus) 属、ハロアーキュラ (Halorcula) 属、ハロフェラックス (Haloferox) 属、ハロバキュラム (Halobaculum) 属、ハロルブルム (Halorubrum) 属、ナトウリアルバ (Natrialba) 属、ナトウロノモナス (Natronomonas) 属、ハロジエオメトリカム (Halogeometricum) 属、及びハロテリジエナ (Haloterrigena) 属等のハロバクテリアレス (Halobacteriales) 目等由来のPPaseが挙げられる。

【0034】本発明においては、これら古細菌由来のPPaseの中でも、好熱性又は超好熱性古細菌由来のPPaseを使用することが好ましく、とりわけメタノコッカス属、サーモコッカス属、バイロコッカス属、サーモプラズマ属、メタノバクテリウム属由来のPPaseを使用することが好ましい。

【0035】また、古細菌由来のFKBPタイプのPPaseは、分子量が17-18 kDa程度の短いタイプのものと、分子量が26-33 kDa程度の長いタイプのものとに分類される (Maruyama, T and Furutani, MFront Biosci. 2000 Sep 1, 5, D821-836; Iida et al., 2000, Gene 256, 319-326)。本発明においては、いずれの分子量のPPaseを用いてもよいが、発現-リフォールディング効率の観点から、17-18 kDa程度の短いものを用いることが好ましい。古細菌由来PPaseの一例として、メタノコッカス・ヤナシイ由来の18 kDa FKBPタイプPPaseのアミノ酸配列と遺伝子配列を、配列番号1、2にそれぞれ示す。

【0036】トリガーファクタータイプPPaseは、ヒト由来12 kDa FKBPタイプPPaseと相同性の高い領域を有し、そのN末端とC末端に、そ

れぞれ約140アミノ酸と約200アミノ酸からなるドメインを形成するタンパク質である (Zarnt, et al. (1997) J. Mol. Biol. 271, 827-837)。これらは、タンパク質新生の初期段階においてリボソームと相互作用し、タンパク質のフォールディングに関与していると言われている。本発明で用いられるトリガーファクタータイプPPIaseとしては、大腸菌やバチラス、サーモトガ、マイコバクテリウム、マイコプラズマ等、バクテリア由来のものが挙げられる。バクテリア由来PPIaseの一例として、大腸菌由来のトリガーファクタータイプPPIaseのアミノ酸配列と遺伝子配列を、配列番号3、4にそれぞれ示す。

【0037】真核生物由来のFKBPタイプPPIaseは、分子量が約52kDaであり、p59又はHSP56等と呼ばれる。そのアミノ酸配列は、ヒト由来12kDa FKBPタイプPPIaseと相同性の高い領域2つがタンデムに連なり、さらに、そのC末端側にカルモジュリン結合部位を含む領域が連なった構造を有する (Ratajczak, T., et al. 1993, J. Biol. Chem. 268, 13187-13192)。また、これらは、PPIase活性だけでなく、シャベロン様活性を持つことが報告されている (Bose, S., et al. (1996) Science 274, 1715-1717)。本発明においては、ヒト由来のものと相同性が高く、シャベロン様活性を示すものであれば、いずれのFKBP52タイプPPIaseを用いてもよい。真核生物由来FKBPタイプPPIaseの一例として、ヒト由来のFKBP52タイプPPIaseのアミノ酸配列と遺伝子配列を、配列番号5、6にそれぞれ示す。

【0038】本発明においては、上記PPIaseのいずれを用いてもよく、また2種以上を併用してもよいが、発現-リフォールディング効率の観点からは、古細菌由来の約16-18kDaのFKBPタイプPPIaseを用いることが好ましい。さらに、本発明においては、タンパク質のフォールディング効率を向上させるために、ジスルフィド結合の組替えを促進する機能を有するPDI (プロテインジスルフィドイソメラーゼ) を併用してもよい。

【0039】2. 抗体遺伝子とPPIase遺伝子との共発現

本発明においては、好ましい実施態様の一つとして、シャベロン様活性を有するPPIase遺伝子とともに抗体遺伝子を形質転換体内で共発現させ、抗体遺伝子の発現産物を可溶性画分に產生させる。

【0040】PPIase遺伝子とともに抗体遺伝子を共発現させる方法としては、PPIaseをコードする遺伝子を、例えば、pACYC系プラスミドの発現プロモーターの下流部に挿入し、宿主菌内に導入すればよ

い。抗体遺伝子がpET等のcole系のDNA複製開始領域を持つ発現ベクターに挿入されている場合、pACYCベクターは同ベクターと宿主菌内で共存可能であるため、それぞれのプラスミドに別の葉剤耐性マーカーを所有させておけば、両遺伝子が導入された形質転換体を選別でき、また、両遺伝子はそれぞれのプロモーター制御下で発現が可能となる。逆に、目的タンパク質をpACYC系に、PPIase遺伝子をcole系に組み込んでもよい。もちろん、PPIase遺伝子と抗体遺伝子を、一つの発現ベクター上に直列に挿入し、1つ又は2種以上のプロモーターで発現を制御してもよい。両遺伝子を含む形質転換体を適当な培地で培養し、両遺伝子の発現を誘導すれば、PPIaseのPPIase活性及びシャベロン様活性等の効果により、抗体のミスフォールディングが抑制されるとともに、抗体の封入体形成が妨げられ、可溶性画分に抗体が高効率に產生される。

【0041】3. 封入体のリフォールディング

本発明においては、好ましい他の実施態様の一つとして、大腸菌等の形質転換体によって封入体として発現させたモノクローナル抗体を変性剤によって可溶化し、シャベロン様活性を有するPPIaseの共存下でリフォールディングさせる。

【0042】封入体は、不溶性のため、菌体を超音波破碎し、その不溶性画分を精製することで得られ、尿素又は塩酸グアニジン等を用いて可溶化することができる。可溶化した抗体をリフォールディングするには、可溶化した目的の抗体を上記のPPIaseと共にすればよい。具体的には、封入体として発現した抗体を、あらかじめ8M尿素や6M塩酸グアニジンで可溶化しておき、PPIaseを含む緩衝液で30-200倍に希釈すればよい。必要に応じて、緩衝液にはDTT等の様な還元剤やEDTA等のようなキレート剤等を加えておいてもよい。抗体とPPIaseの混合比率は、モル比で、抗体1に対して、通常0.01-100、好ましくは0.1-30である。

【0043】4. 抗体

本発明の製造方法が適用可能な抗体としては、いずれの動物種由来の抗体であっても、いずれのサブクラスの抗体であってもよく、また、抗体全長であっても、Fab、scFV等であってもよい。本発明の製造方法は、Fabの产生、特に、マウス由来IgGからのFabの产生に好適に用いることができる。

【0044】

【実施例】以下、本発明の製造方法をさらに詳細に説明するために、実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例によって限定されるものではない。

【0045】【実施例1】サーモコッカスsp. KS-1由来FKBPタイプPPIaseのシャベロン様活性

Thermoplasma acidophilum由来クエン酸合成酵素（以後CSという；Sigma社）を6M塩酸グアニジン及び5mM DTTを含む25mMリソ酸ナトリウム（pH7.0）中に溶解し、50°Cで30分変性させた。この変性CS 1に対し、特開平11-318464号公報記載のサーモコッカスsp. KS-1由来FKBPタイプPPase（以後TcFK）1.5-30倍量を含む25mMリソ酸ナトリウム（pH7.0）で40倍に希釈することによりフォールディングを開始させた。反応は50°Cで50分間（図1-1）、及び、30°Cで90分間（図1-2）行った。反応中のCSの最終濃度は0.33μMとした。CSの活性は文献[Srere, P. A., et al., (1963) Acta Chem. Scand. 17, S129-S134; Furutani, M., et al., (1998) J. Biol. Chem. 273, 28399-28407]に従って測定し、ネイティブ型CSの活性を100%として相対評価した。50°Cの実験に関しては、TcFKの代わりにRNase T1を、30°Cの実験ではBSA及びヒト12kDa

FKBPタイプPPaseをそれぞれ比較例として用いた。図1-1に示すとおり、TcFKは変性したCSのフォールディング収量を上げるシャペロン様活性を示した。比較例として用いたRNase T1にはシャペロン様活性は見られなかった。また、図1-2に示すように、30°CにおいてもTcFKはCSのフォールディング収量を向上させたのに対し、BSA及びヒト12kDa FKBPタイプPPaseにはシャペロン様活性は見られなかった。

【0046】〔実施例2〕サーモコッカスsp. KS-1由来FKBPタイプPPase及びその発現ユニットのクローニング

特開平11-318464号公報記載のサーモコッカスsp. KS-1由来FKBPタイプPPase（Tc* TcFK遺伝子の増幅に用いたプライマー

名称	配列
TcFK-Fc2	5'-ggggcatgcaattaatcgcactcaactatagg-3'
TcFK-Rc1	5'-cctctagaaagctaaagcttctgagtc-3'

【0048】

【表2】

PCRの反応組成

Reaction buffer(x10)	10μl
DNTP	8μl
Ex Taq	0.5μl
pBFE1-3(10ng/μl)	2μl
TcFK-Fc2 (20pmol/μl)	4μl
TcFK-Rc1 (20pmol/μl)	4μl
滅菌水	71.5μl
合計	100μl

【0049】

【表3】

* FKの発現用プラスミドpBFE1-3を鋳型とし、T7プロモーターを上流に含むTcFK遺伝子をPCR法によって増幅した。遺伝子増幅用のプライマーとして、TcFK-Fc2及びTcFK-Rc1をそれぞれ用いた（表1）。また、PCRの反応組成及び反応サイクルは、それぞれ表2及び表3に示すとおりである。DNAポリメラーゼは、Takara社Ex. Taqを使用した。PCR法によって得られた増幅産物を、2%アガロースゲル電気泳動により分離後、DNA断片を含むバンド部分を切り出し、フェノール・クロロホルム処理及びエタノール沈殿により目的DNAの抽出を行った。DNA断片を滅菌水に溶解し、各約10~100ngに対して10倍量のpT7 blue Tプラスミドベクター（Novagen）を加え、さらに16°Cにて1時間処理することによりDNA断片をライゲーションした。上記ライゲーション液をコンビテントセル大腸菌JM109株に加えることによりトランスフォーメーションした。これら菌株の懸濁液を100μg ml⁻¹アンビシリンナトリウム、100μM IPTG及び0.004%X-Galを含有するLB寒天培地に接種し、一晩37°Cにて培養し、得られたホワイトコロニーについて、その菌株のプラスミドDNAを鋳型とするPCRを行い、DNA断片に対応するプライマーで増幅されるコロニーを陽性コロニーとした。陽性コロニーからpT7プラスミドDNAを回収した後、プラスミドを鋳型とし、BIG Dye (PERKIN-ELMER) を用いたシーケンス反応（プライマーはT7プロモータープライマー及びU-19リバースプライマー）を行うことにより、得られたPCR産物の塩基配列を決定した。この配列をサーモコッカスsp. KS-1のTcFK遺伝子の塩基配列、及びT7プロモータ領域のそれと比較した結果、その遺伝子の配列と相違ないことを確認した。

【0047】

【表1】

PCRの反応条件		
プレヒート	94°C × 5min	1cycle
変性	94°C × 0.5min	
アニーリング	58°C × 1min	30cycle
増幅	72°C × 1min	

【0050】〔実施例3〕サーモコッカスsp. KS-1由来FKBPタイプPPaseの発現系構築

PPase遺伝子及びT7プロモータ領域を含むpT7 blueプラスミドDNAについて制限酵素処理を行い、PPase遺伝子発現ユニットをコードするDNA断片の切り出しを行った。制限酵素はSph I及びBam H Iの組み合わせを用いた。切断した遺伝子断

片は2%アガロースゲルにより、分離・抽出した後、あらかじめ制限酵素処理したpACYC184プラスミドDNA（和光純薬）にライゲーションした。得られたライゲーション反応液を100μg ml⁻¹クロラムフェニコールを含有するLB寒天培地に接種し、一晩37°Cにて培養し、得られたコロニーについて、その菌株のプラスミドDNAを錠型とするPCRを行い、DNA断片に対応するプライマーで増幅されるコロニーを陽性コロニーとした。PPIase遺伝子を含む陽性コロニーからpACYC184プラスミドDNAを回収した。

【0051】〔実施例4〕マウス由来抗-卵白リゾチム(HEL)Fab遺伝子のクローニング

Ibaらによって構築されたAnti-HEL-Fab発現用プラスミドpAALFabを錠型とし(Iba, Y., et al. 1997, Gene 194, 35-46)、H鎖及びL鎖をPCR法によって増幅した。遺伝子増幅用のプライマーとして、H鎖についてはHEL-VH-F1及びHEL-VH-R1を、L鎖についてはHEL-VL-F1及びHEL-VL-R1をそれぞれ用いた(表4)。また、PCRの反応組成及び反応サイクルは、それぞれ表5及び表6に示すおりである。DNAポリメラーゼは、Takara社Ex. Taqを使用した。PCR法によって得られた各々の増幅産物を、2%アガロースゲル電気泳動により分離後、DNA断片を含むバンド部分を切り出し、フェノール・クロロホルム処理及*

*びエタノール沈殿により目的DNAの抽出を行った。H鎖及びL鎖それぞれのDNA断片を滅菌水に溶解し、各約100~100ngに対して10倍量のpT7blueプラスミドベクター(Novagen)を加え、さらに16°Cにて1時間処理することによりそれぞれのDNA断片をライゲーションした。上記ライゲーション液をそれぞれのコンビテントセル大腸菌JM109株に加えることによりトランスフォーメーションした。これら菌株の懸濁液を100μg ml⁻¹アンビシリントリウム、100μM IPTG及び0.004%X-Galを含有するLB寒天培地に接種し、一晩37°Cにて培養し、得られたホワイトコロニーについて、その菌株のプラスミドDNAを錠型とするPCRを行い、DNA断片に対応するプライマーで増幅されるコロニーを陽性コロニーとした。それぞれの陽性コロニーからpT7プラスミドDNAを回収した後、プラスミドを錠型とし、BIG Dye (PERKIN-ELMER)を用いたシーケンス反応(プライマーはT7プロモータープライマー及びU-19リバースプライマー)を行うことにより、得られたPCR産物の塩基配列を決定した。この配列をAnti-HEL-Fab H鎖、及びL鎖の遺伝子の塩基配列と比較した結果、それらの遺伝子の配列と相違ないことを確認した。

【0052】

【表4】

Anti-HEL-Fab遺伝子の増幅に用いたプライマー

名称	配列
HEL-VH-F1	5'-cccatatgcaggatgcagctgcggcaagatca-3'
HEL-VH-R1	5'-ggaagcttgcactgtctccttggaaatttgc-3'
HEL-VL-F1	5'-ccaaatgtatggacatcgagctcacc-3'
HEL-VL-R1	5'-ggggatccttaatgcactcactcatt-3'

【0053】

【表5】

PCRの反応組成

Reaction buffer(x10)		
DNTP	10μl	
Ex Taq	8μl	
pAALFab(10ng/μl)	0.5μl	
HEL-VH-F1又はHEL-VL-F1(20pmol/μl)	2μl	
HEL-VH-R1又はHEL-VL-R1(20pmol/μl)	4μl	
滅菌水	4μl	
合計	71.5μl	
	100μl	

【0054】

【表6】

PCRの反応条件

プレヒート	94°C × 5min	1cycle
変性	94°C × 0.5min	
アニーリング	60°C × 1min	30cycle
増幅	72°C × 1min	

【0055】〔実施例5〕マウス由来抗-卵白リゾチム(HEL)Fab遺伝子の発現系構築

Anti-HEL-Fab H鎖、及び、L鎖をコード

する遺伝子を含むそれぞれのpT7blueプラスミドDNAについて制限酵素処理を行い、Anti-HEL-Fab遺伝子断片の切り出しを行った。制限酵素はH鎖についてはNde I及びHind IIIの組み合わせを、L鎖についてはHind III及びBam

H Iをそれぞれ用いた。切断した遺伝子断片はそれぞれ2%アガロースゲルにより、分離・抽出した後、H鎖及びL鎖の順であらかじめ制限酵素(Nde I及びBam H I)処理したpET21aプラスミドDNA(Novagen)にライゲーションした。得られたライゲーション反応液をコンビテントセル大腸菌JM109株に加えることによりトランスフォーメーションした後、H鎖及びL鎖双方のAnti-HEL-Fab遺伝子を含む陽性コロニーからpET21aプラスミドDNAを回収した。

【0056】〔実施例6〕PPIase遺伝子とFab遺伝子の共発現

実施例3及び実施例5で得られたTcFK遺伝子を含むpACYC184プラスミド、及びAnti-HEL-

Fab遺伝子を含むpET21aプラスミドの共発現を試みた。両プラスミドをコンビテントセル大腸菌BL21 (DE3) 株に加えることによりトランسفォーメーションした後、100 μg/ml アンビシリン及びクロラムフェニコールを含む寒天培地にて培養した。得られたコロニーを2×YT培地 (Yeast Extract 16 g L⁻¹, BACTOTRYPTON 20 g L⁻¹, NaCl 5 g L⁻¹, アンビシリン 100 μg ml⁻¹, クロラムフェニコール 100 μg ml⁻¹, pH 7.5) 700 ml に接種した。35°Cで回転培養 (110 rpm) した後、OD600が0.7となった時点で100 mM IPTGを添加することにより、TcFK及びAnti-HEL-Fabの発現を誘導した。遠心分離 (10000 rpm × 10 min) にて菌体を回収した。得られた菌体は1 mM EDTAを含む25 mM HEPE S緩衝液 (pH 6.8) 20 ml に懸濁し、-20°Cにて一晩凍結保存した。菌体を超音波破碎後、上清及び沈澱画分に分離し、それぞれを SDS-PAGEに供した (図2)。なお、図2-1中のレーン1はTcFK及びAnti-HEL-Fabを共発現させた大腸菌液、レーン2及び3は、それぞれ、その破碎液上清及び沈澱画分である。また、レーン4は、実施例4にて、大腸菌にTcFK遺伝子を組み込まず、クロラムフェニコールを除いた2×YT培地で培養した大腸菌の菌液である (比較例)。また、レーン5及び6は、それぞれ、その破碎液上清及び沈澱画分である。TcFKを発現させなかった場合、Anti-HEL-Fab遺伝子は不溶性画分に発現した (レーン6)。また、図2-2に示すように、発現したAnti-HEL-Fabを、anti-mouse IgG抗体を用いたウエスタンプロッティングにより確認した。上記のように、従来封入体としてしか発現しなかった抗体遺伝子を、TcFK遺伝子との共発現により、可溶画分に産生することが可能となった。

【0057】 [実施例7] Fabの活性測定

得られたFabの活性は、HELを抗原とするELISA法において、1次抗体として機能するか否かで評価した。すなわち、96穴プレートに0.1 mg/ml ニワトリ卵白リゾチーム (HEL) 溶液 100 μl を添加し、30°Cにて3時間インキュベーションすることにより、HELを固定化した。PBS緩衝液 (pH 7.0) にてプレートを洗浄後、ブロックエース (大日本製薬) を含むPBS緩衝液でブロッキングした (4°C、オーバーナイト)。PBSにて洗浄後、実施例6のTcFKとの共発現の結果得られた可溶性Anti-HEL-Fab*

* bを含む大腸菌上清液及び10%ブロックエースを含むPBSを1次抗体液として用い、室温にて3時間インキュベートした。PBSにて洗浄後、2次抗体として0.1% Anti-mouse IgG-HRPコンジュゲート (フナコシ) を含むPBS緩衝液でインキュベート (2時間、30°C) した。PBSにて洗浄後、HRPの基質としてABTS液 (フナコシ) 100 μl を加え、30分間インキュベートし、OD405を測定した。得られた結果を図3に示す。TcFKと共に発現させたAnti-HEL-Fabを含む大腸菌破碎液を1次抗体液として用いた場合、抗原に特異的に結合することが明らかである (■)。TcFKと共に発現させたAnti-HEL-Fabを含む大腸菌破碎液の代わりに、共発現させなかった大腸菌破碎液を用いた場合と比べ (□)、有意に一次抗体として機能していることが明らかである。

【0058】 [実施例8] 封入体のフォールディングと活性評価

実施例6で得られたAnti-HEL-Fabの封入体を精製し、6Mグアニジン塩酸を含むPBS緩衝液 (pH 7.0) で1時間室温にてインキュベーションすることにより、封入体を可溶化させた。この変性Anti-HEL-Fab1に対し、20倍量のTcFKを含む25 mM リン酸ナトリウム (pH 7.0) で40倍に希釈することにより、Anti-HEL-Fabのフォールディングを開始させた。反応は30°Cで90分間行った。得られた反応溶液を実施例7に記載した方法により、フォールディングしたAnti-HEL-Fabが一次抗体として機能するか否かを検討した。実施例7で用いた大腸菌破碎液の代わりに、上記反応溶液を用いてELISAにて評価した。結果を図4に示す。TcFKと反応させたAnti-HEL-Fabは (■)、作用させなかったものと比べ (□)、有意に一次抗体として機能していることが明らかである。これらは抗原がない場合、全く反応せず、高い特異性を示した。

【0059】

【発明の効果】以上とおり、本発明によれば、実験動物を用いることなく、高効率に高特異性、高親和性のモノクローナル抗体を調製することができる。また、本発明によれば、抗体遺伝子と他のタンパク質やペプチド等をコードする遺伝子とを結合させることにより、多機能な抗体を調製することも可能となる。得られた抗体は、基礎研究分野だけでなく、診断分野、医療分野等の応用面においても極めて有用である。

【0060】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sekisui Chemical Co.,Ltd
<110> Marine Biotechnology Institute
<130> 01P00164
<160> 6

(10)

10002002-262883

17

18

<210> 1
<211> 157
<212> PRT
<213> Methanococcus jannaschii
<400> 1
Met Ile Asn Leu Ile Lys Lys Gly Asp Tyr Val Lys Val Asp Tyr Ile
1 5 10 15
Leu Glu Val Asp Gly Lys Val Ile Asp Thr Ser Ile Glu Glu Val Ala
20 25 30
Lys Glu Asn Lys Ile Tyr Tyr Pro Glu Arg Glu Tyr Glu Pro Ile Gly
35 40 45
Phe Ile Val Gly Asn Gly Glu Leu Ile Glu Gly Phe Glu Glu Ala Val
50 55 60
Ile Gly Met Glu Val Gly Glu Glu Lys Thr Val Thr Ile Pro Pro Glu
65 70 75 80
Lys Gly Tyr Gly Leu Arg Asp Glu Arg Leu Ile Gln Glu Ile Pro Lys
85 90 95
Glu Met Phe Ala Asp Ala Asp Phe Glu Pro Gln Glu Gly Met Leu Ile
100 105 110
Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Lys Ile Ile Lys Val Thr Asp Asp Thr
115 120 125
Val Thr Leu Asp Phe Asn His Glu Leu Ala Gly Lys Glu Leu Lys Phe
130 135 140
Thr Ile Lys Val Arg Asp Val Gln Pro Ala Glu Ser Glu
145 150 155

<210> 2

<211> 471

<212> DNA

<213> Methanococcus jannaschii

<400> 2

atg att aac ttg att aaa aaa ggt gac tat gtc aaa gta gat tat ata 48
tta gaa gta gat gga aaa gtt att gac aca tca att gaa gaa gta gct 96
aaa gaa aat aaa ata tac tat cct gaa aqa gaa tat gaa cca att gga 144
ttt att gta ggt aat gga gaa tta atc gaa ggt ttt gaa gaa gct gtt 192
ata ggc atg gaa gtt gga gaa gaa aaa act gta aca att cct cct gaa 240
aaa ggt tat gga ctt aqa gat gaa gaa tta atc caa gaa ata cct aag 288
gaa atg ttt gct gat gct gac ttt gaa cca caq gaa gaa atg tta atc 336
tta gcc agt gga att cct gca aag ata ata aaa gtt act gat gat act 384
gta act tta gac ttt aac cac gaa gct gaa aaa gaa tta aaa ttc 432
aca ata aaa gta aqa gat gtc caq cca gct gaa tca gaa taa 471

<210> 3

<211> 432

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 3

Met Gln Val Ser Val Glu Thr Thr Gln Gly Leu Gly Arg Arg Val Thr
1 5 10 15
Ile Thr Ile Ala Ala Asp Ser Ile Glu Thr Ala Val Lys Ser Glu Leu

19

20

20

25

30

Val Asn Val Ala Lys Lys Val Arg Ile Asp Gly Phe Arg Lys Gly Lys
 35 40 45

Val Pro Met Asn Ile Val Ala Gln Arg Tyr Gly Ala Ser Val Arg Gln
 50 55 60

Asp Val Leu Gly Asp Leu Met Ser Arg Asn Phe Ile Asp Ala Ile Ile
 65 70 75 80

Lys Glu Lys Ile Asn Pro Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Val Pro Gly Glu
 85 90 95

Tyr Lys Leu Gly Glu Asp Phe Thr Tyr Ser Val Glu Phe Glu Val Tyr
 100 105 110

Pro Glu Val Glu Leu Gln Gly Leu Glu Ala Ile Glu Val Glu Lys Pro
 115 120 125

Ile Val Glu Val Thr Asp Ala Asp Val Asp Gly Met Leu Asp Thr Leu
 130 135 140

Arg Lys Gln Gln Ala Thr Trp Lys Glu Lys Asp Gly Ala Val Glu Ala
 145 150 155 160

Glu Asp Arg Val Thr Ile Asp Phe Thr Gly Ser Val Asp Gly Glu Glu
 165 170 175

Phe Glu Gly Gly Lys Ala Ser Asp Phe Val Leu Ala Met Gly Gln Gly
 180 185 190

Arg Met Ile Pro Gly Phe Glu Asp Gly Ile Lys Gly His Lys Ala Gly
 195 200 205

Glu Glu Phe Thr Ile Asp Val Thr Phe Pro Glu Glu Tyr His Ala Glu
 210 215 220

Asn Leu Lys Gly Lys Ala Ala Lys Phe Ala Ile Asn Leu Lys Lys Val
 225 230 235 240

Glu Glu Arg Glu Leu Pro Glu Leu Thr Ala Glu Phe Ile Lys Arg Phe
 245 250 255

Gly Val Glu Asp Gly Ser Val Glu Gly Leu Arg Ala Glu Val Arg Lys
 260 265 270

Asn Met Glu Arg Glu Leu Lys Ser Ala Ile Arg Asn Arg Val Lys Ser
 275 280 285

Gln Ala Ile Glu Gly Leu Val Lys Ala Asn Asp Ile Asp Val Pro Ala
 290 295 300

Ala Leu Ile Asp Ser Glu Ile Asp Val Leu Arg Arg Gln Ala Ala Gln
 305 310 315 320

Arg Phe Gly Gly Asn Glu Lys Gln Ala Leu Glu Leu Pro Arg Glu Leu
 325 330 335

Phe Glu Glu Gln Ala Lys Arg Arg Val Val Val Gly Leu Leu Leu Gly
 340 345 350

Glu Val Ile Arg Thr Asn Glu Leu Lys Ala Asp Glu Glu Arg Val Lys
 355 360 365

Gly Leu Ile Glu Glu Met Ala Ser Ala Tyr Glu Asp Pro Lys Glu Val
 370 375 380

Ile Glu Phe Tyr Ser Lys Asn Lys Glu Leu Met Asp Asn Met Arg Asn
 385 390 395 400

Val Ala Leu Glu Glu Gln Ala Val Glu Ala Val Leu Ala Lys Ala Lys
 405 410 415

Val Thr Glu Lys Glu Glu Thr Thr Phe Asn Glu Leu Met Asn Gln Gln Ala

21

(12)

420

425

2002-262883

22

430

<210> 4

<211> 1296

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 4

atg caa gtt tca gtt gaa acc act caa ggc ctt ggc cgc cgt gta acg 48
att act atc gct gct gac agc atc qaq acc gct gtt aaa aqg qaq ctg 96
gtc aac gtt gcg aaa aaa gta cgt att gac ggc ttc cgc aaa ggc aaa 144
gtq cca atq aat atc gtt gct cag cgt tat ggc qcg tct gta cgc cag 192
gac gtt ctg qgt gac ctg atq aqg cgt aac ttc att gac gcc atc att 240
aaa gaa aaa atc aat ccg gct ggc qca ccg act tat gtt ccg ggc gaa 288
tac aqg ctg qgt gaa gac ttc act tac tct gta qag ttt gaa gtt tat 336
ccg gaa gtt gaa ctg cag qgt ctg gaa gcg atc gaa gtt gaa aaa ccg 384
atc gtt gaa gtq acc gac gct gac gtc atq ctg gat act ctg 432
cgt aaa caq caq qcg acc tqg aaa gaa aaa gac ggc gct gtt gaa qca 480
gaa gac cgc qta acc atc gac ttc acc ggt tct gta gac ggc gaa qag 528
ttc gaa ggc qgt aaa gcg tct gat ttc gta ctg gcg atg ggc caq qgt 576
cgt atq atc ccg ggc ttt gaa gac qgt atc aaa ggc cac aaa gct ggc 624
gaa gag ttc acc atc gac gtq acc ttc ccg gaa gaa tac cac qca gaa 672
aac ctg aaa qgt aaa gca qcg aaa ttc gct atc aac ctg aag aaa gtt 720
gaa gag cgt gaa ctg ccg gaa ctg act qca gaa ttc atc aaa cgt ttc 768
ggc gtt gaa gat qgt tcc gta gaa qgt ctg cgc gct gaa gtq cgt aaa 816
aac atg qag cgc qag ctg aag aqg qcc atc cgt aac cgc gtt aag tct 864
cag qcg atc gaa qgt ctg gta aaa gct aac gac atc gac gta ccg gct 912
qcg ctg atc gac aqg qaa atc gac qtt ctg cgt cgc caq gct qca caq 960
cgt ttc qgt ggc aac gaa aaa caa qct ctg gaa ctg ccg cgc gaa ctg 1008
ttc gaa gaa cag qct aaa cgc cgc qta gtt gtt ggc ctg ctg ggc 1056
gaa gtt atc cgc acc aac qag ctg aaa qct gac gaa gag cgc gtq aaa 1104
ggc ctg atc gaa qag atq gct tct qcg tac gaa gat ccg aaa gaa qtt 1152
atc qag ttc tac aqg aia aac aaa gaa ctg atq gac aac atg cgc aat 1200
gtt qct ctg gaa gaa caq gct qtt gaa gct gta ctg gcg aaa gcg aaa 1248
gtq act gaa aaa gaa acc act ttc aac qag ctg atq aac cag caq gcg 1296
taa 1299

<210> 5

<211> 459

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Thr Ala Glu Glu Met Lys Ala Thr Glu Ser Gly Ala Gln Ser Ala
1 5 10 15
Pro Leu Pro Met Glu Gly Val Asp Ile Ser Pro Lys Gln Asp Glu Gly
20 25 30
Val Leu Lys Val Ile Lys Arg Glu Gly Thr Gly Thr Glu Met Pro Met
35 40 45
Ile Gly Asp Arg Val Phe Val His Tyr Thr Gly Trp Leu Leu Asp Gly
50 55 60
Thr Lys Phe Asp Ser Ser Leu Asp Arg Lys Asp Lys Phe Ser Phe Asp
65 70 75 80

23

24

Leu Gly Lys Gly Glu Val Ile Lys Ala Trp Asp Ile Ala Ile Ala Thr
 85 90 95
 Met Lys Val Gly Glu Val Cys His Ile Thr Cys Lys Pro Glu Tyr Ala
 100 105 110
 Tyr Gly Ser Ala Gly Ser Pro Pro Lys Ile Pro Pro Asn Ala Thr Leu
 115 120 125
 Val Phe Glu Val Glu Leu Phe Glu Phe Lys Gly Glu Asp Leu Thr Glu
 130 135 140
 Glu Glu Asp Gly Gly Ile Ile Arg Arg Ile Gln Thr Arg Gly Glu Gly
 145 150 155 160
 Tyr Ala Lys Pro Asn Glu Gly Ala Ile Val Glu Val Ala Leu Glu Gly
 165 170 175
 Tyr Tyr Lys Asp Lys Leu Phe Asp Gln Arg Glu Leu Arg Phe Glu Ile
 180 185 190
 Gly Glu Gly Glu Asn Leu Asp Leu Pro Tyr Gly Leu Glu Arg Ala Ile
 195 200 205
 Gln Arg Met Glu Lys Gly Glu His Ser Ile Val Tyr Leu Lys Pro Ser
 210 215 220
 Tyr Ala Phe Gly Ser Val Gly Lys Glu Lys Phe Gln Ile Pro Pro Asn
 225 230 235 240
 Ala Glu Leu Lys Tyr Glu Leu His Leu Lys Ser Phe Glu Lys Ala Lys
 245 250 255
 Glu Ser Trp Glu Met Asn Ser Glu Glu Lys Leu Glu Gln Ser Thr Ile
 260 265 270
 Val Lys Glu Arg Gly Thr Val Tyr Phe Lys Glu Gly Lys Tyr Lys Gln
 275 280 285
 Ala Leu Leu Gln Tyr Lys Ile Val Ser Trp Leu Glu Tyr Glu Ser
 290 295 300
 Ser Phe Ser Asn Glu Glu Ala Gln Lys Ala Gln Ala Leu Arg Leu Ala
 305 310 315 320
 Ser His Leu Asn Leu Ala Met Cys His Leu Lys Leu Gln Ala Phe Ser
 325 330 335
 Ala Ala Ile Glu Ser Cys Asn Lys Ala Leu Glu Leu Asp Ser Asn Asn
 340 345 350
 Glu Lys Gly Leu Phe Arg Arg Gly Glu Ala His Leu Ala Val Asn Asp
 355 360 365
 Phe Glu Leu Ala Arg Ala Asp Phe Gln Lys Val Leu Gln Leu Tyr Pro
 370 375 380
 Asn Asn Lys Ala Ala Lys Thr Gln Leu Ala Val Cys Gln Gln Arg Ile
 385 390 395 400
 Arg Arg Gln Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Tyr Ala Asn Met Phe Glu
 405 410 415
 Arg Leu Ala Glu Glu Glu Asn Lys Ala Lys Ala Glu Ala Ser Ser Gly
 420 425 430
 Asp His Pro Thr Asp Thr Glu Met Lys Glu Glu Gln Lys Ser Asn Thr
 435 440 445
 Ala Gly Ser Gln Ser Gln Val Glu Thr Glu Ala
 450 455

<211> 1377

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

atq aca qcc qag qaq atq aaq qcq acc	qag agc qgg qgc caq tcq qcq	48
ccq ctq ccc atq qag qga qtq qac atc	aqc ccc aaa caq gac qaa qgc	96
gtq ctq aaq qtc atc aag aga qag qgc	aca qgt aca qag atq ccc atq	144
att qgg qac cga qtc ttt qtc cac tac	act qgc tgg cta tta qat qgc	192
aca aag ttt qac tcc aqt ctq qat cgc	aag qac aaa ttc tcc ttt qac	240
ctq qga aaa qgg qag qtc atc aag qct	tgg qac att gcc ata gcc acc	288
atq aag qtq qgg qag qtq tgc cac atc	acc tgc aaa cca qaa tat qcc	336
acc tgc aat qgg qag qtq qat cct	cca aag att ccc ccc aat gcc acq ctt	384
qta ttt qag qtq gag ttg ttt aag qga	qaa gat ctq acq gaa	432
qag qaa gat qgc qga atc att cgc aqa	ata caq act cgc qgt qaa qgc	480
tat qct aag ccc aat qag qgt qct atc	gtq qag qtt qca ctq gaa qgg	528
tac tac aag gac aag ctc ttt qac	cag cqg qag ctc cgc ttt qag att	576
qgc qag qgg qag aac ctq qat ctq cct	tat qgt ctq qag aqg qcc att	624
caq cgc atq qag aaa qga gaa cat	tcc atc qtq tac ctc aag ccc aqc	672
tat qct ttt qgc aqt qtt qgg aag qaa	aaq ttc caa atc cca cca aat	720
qct qag ctq aaa tat qaa tta cac ctc	aaq aqt ttt qaa aag qcc aag	768
qag tct tgg qag atq aat tca gaa qag	aag ctg qaa caq aqc acc ata	816
gtq aaa qag cgg qgc act qtq tac ttc	aaq gaa qgt aaa tac aag caa	864
qct tta cta cag tat aag aag atc	qta tct tgg ctg qaa tat qag tct	912
agt ttt tcc aat qag qaa qca caq	aat qgc ctt cga ctq qcc	960
tct cac ctc aac ctq gcc atq tgt	cat ctq aaa cta caq gcc ttc tct	1008
qct gcc att qaa aqc tgt aac aag	qcc cta qaa ctg qac aqc aac aac	1056
qag aag qgc ctc ttc cgc cqg qga	qag gcc cac ctq qcc qtq aat qac	1104
ttt qaa ctg qca cqg qct qat ttc	qag qtc ctg caq ctc tac ccc	1152
aac aac aaa qcc qcc aag acc	cag ctg gct qtq tgc caq cqg atc	1200
cga aqg caq ctt qcc cqg qag aag	aat qcc aat atq ttt qag	1248
agg ctg qct qag qag aac aag	qcc aag qca qag qct tcc tca qga	1296
qac cat ccc act qac aca qag atq	aag qag caq aag aqc aac acg	1344
qca qgg aqc caq tct caq qtq qag	aca qaa qca tag	1377

【図面の簡単な説明】

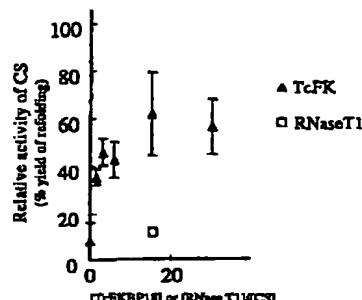
【図1】サーモコッカス s p. K S - 1 由来 F K B P タ

イブ P P I a s e のシャベロン様活性を示す図である。

【図2】古細菌由来 F K B P 型 P P I a s e とマウス由
来 A n t i - H E L - F a b の共発現を示す図である。【図3】共発現で得られた A n t i - H E L - F a b の
活性を示す図である。【図4】封入体をリフォールディングして得られた A n
t i - H E L - F a b の活性を示す図である。

【図1】

図1-1 TcFKのシャベロン様活性(50°C)



【図2】

図2-1 クーマシーブリリアントブルーによる染色

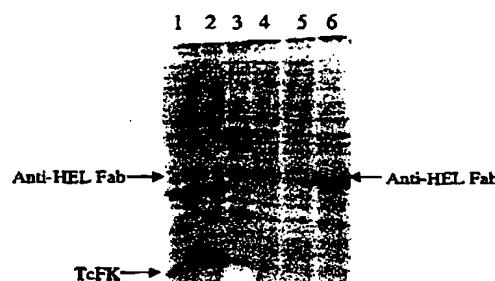
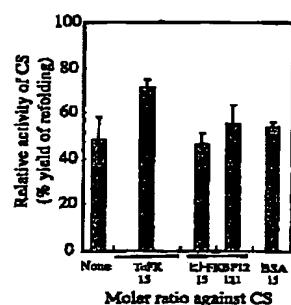


図1-2 TcFKのシャベロン様活性(30°C)



【図3】

図3 共発現の結果得られた組み換え型HEL-Fabの活性評価

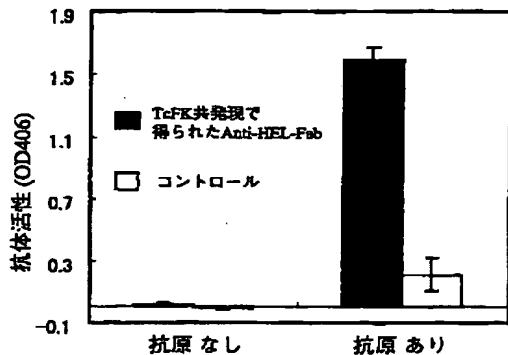
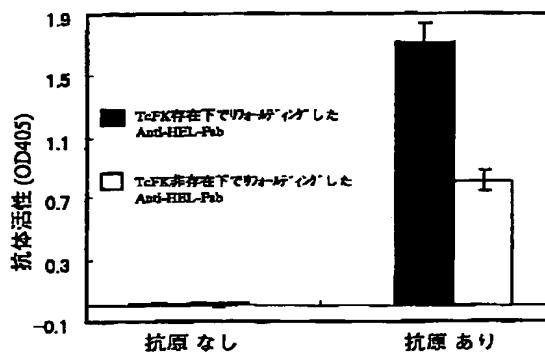


図2-2 抗マウスIgG抗体(ヤギ)による染色



【図4】

図4 インクルージョンボディーをリフォールディングして得られたAnti-HEL-Fabの活性



フロントページの続き

(51)Int.C1.7

識別記号

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 9/90

C 1 2 P 21/08

(C 1 2 P 21/08)

// C 1 2 N 9/90

C 1 2 R 1:01

(C 12 P 21/08
C 12 R 1:01)

C 12 N 15/00
5/00

Z N A A
A

(72)発明者 丸山 正
岩手県釜石市平田第3地割75番1 株式会
社バイオテクノロジー研究所釜石研究所内
(72)発明者 古谷 昌弘
大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学
工業株式会社内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA07 BA43
CA04 DA06 EA04 GA11 HA01
4B050 CC07 DD02 EE10 LL05
4B064 AG27 CA02 CA19 CC24 DA01
DA13
4B065 AA01Y AA26X AA91Y AB01
AC14 BA02 BC50 CA25 CA44
CA46
4H045 AA20 BA10 CA11 CA42 DA76
DA89 EA20 EA50 FA67 FA74